Untersuchungen zur Technik der Stärkegelelektrophorese der Serumproteine

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von

Peter Vogelgesang

Saarbrücken

1974

Aus der Medizinischen Klinik der Universität
des Saarlandes - Lehrstuhl Innere Medizin III
(Direktor: Professor Dr. med. L. Bette)

Untersuchungen zur Technik der Stärkegelelektrophorese der Serumproteine

I N A U G U R A L D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung der Doktorwürde
der
HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

1974

vorgelegt von

Peter Vogelgesang
geb. am 5. 4. 1942 in St. Ingbert

Dekan: Prof. Dr. med. G. A. Jutzler
Referenten: Prof. Dr. med. W. Leppla
Prof. Dr. rer. nat. H. E. Keller

Letzter mündlicher Prüfungstermin : 20. 5. 74

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

G L I E D E R U N G

A. EINLEITUNG:

I. Die elektrokinetischen Erscheinungen.

II. Die Theorie der Freien Elektrophorese.

III. Die Besonderheiten der Elektrophorese in festen, porösen Systemen.

IV. Die Theorie der Stärkegelelektrophorese.

V. Kurze Beschreibung der Methode von O. SMITHIES.

B. PROBLEMSTELLUNG.

C. UNTERSUCHUNGEN:

I. Apparatur

II. Technik

III. Puffersysteme

IV. Messung der Einflüsse von Feldstärke und Temperatur.

V. Arbeitsvorschrift für eine standardisierte Durchführung der Stärkegelelektrophorese.

VI. Anwendungsbeispiele

ANHANG: Das SGE - Pherogramm.

D. ZUSAMMENFASSUNG.

E. LITERATURNACHWEIS.

E I N L E I T U N G

I. Die elektrokinetischen Erscheinungen.

Die Elektrophorese gehört zu den elektrokinetischen Erscheinungen. Solche Erscheinungen treten immer dann auf, wenn eine relative Bewegung zwischen einer flüssigen und einer festen Phase erfolgt und sich an deren Grenzfläche eine elektrische Doppelschicht ausbildet. Die Bewegungen können einmal durch eine Spannung erzwungen werden, die zwischen zwei in eine Elektrolytflüssigkeit eintauchenden Elektroden erzeugt wird (Elektrophorese und Elektroosmose); sie können aber auch unter dem Einfluß eines mechanischen Kraftfeldes erfolgen (Strömungspotential und elektrophoretisches Potential).

Die elektrophoretischen Trennungsmethoden lassen sich auf diese Phänomene zurückführen. Die elektrokinetischen Erscheinungen sollen deswegen im folgenden näher dargestellt werden.

Das Anlegen von Kraftfeldern bewirkt elektrokinetische Erscheinungen, wenn an der Grenzfläche zweier Phasen eine elektrische Doppelschicht vorhanden ist. Mechanische Kraftfelder verursachen die folgenden elektrokinetischen Erscheinungen:

1. Strömungspotential: wird eine flüssige Phase unter dem Einfluß eines mechanischen Kraftfeldes relativ zu einer festen Phase bewegt, so entsteht ein Potential. Dieses Potential nennt man Strömungspotential.

2. Elektrophoretisches Potential: wird ein geladenes Teilchen unter dem Einfluß eines mechanischen Kraftfeldes relativ zu einer flüssigen Phase bewegt, so entsteht ein Potential. Dieses Potential bezeichnet man als elektrophoretisches Potential.

Elektrische Kraftfelder verursachen die folgenden elektrokinetischen Erscheinungen:

1. Elektroosmose: unter dem Einfluß eines elektrischen Kraftfeldes bewegt sich in einem gemeinsamen System die flüssige Phase relativ zur festen Phase (z.B. poröses System). Diese Bewegung bezeichnet man als Elektroosmose. Die feste Phase ist in dem gemeinsamen System unbeweglich.

2. Elektrophorese: unter dem Einfluß eines elektrischen Feldes bewegen sich in einem gemeinsamen System geladene feste Teilchen relativ zu der flüssigen Phase. Diese Bewegung bezeichnet man als Elektrophorese.

Beispiel: in einer Flüssigkeit gelöste Makroionen oder darin suspendierte Teilchen, die eine elektrische Doppelschicht tragen, führen nach Anlegen eines elektri-

schen Feldes eine gerichtete Bewegung durch.

Das zuletzt dargestellte elektrokinetische Phänomen liegt der klassischen Elektrophoresemethode von TISELIUS zugrunde. TISELIUS führt nämlich die Elektrophorese der zu trennenden Teilchen in einem homogenen flüssigen Medium im NERNST'schen U-Rohr aus. Nach Anlegen des elektrischen Feldes kommt es in den beiden Schenkeln des U-Rohres zu Konzentrationsgradienten. Sie können mit Hilfe der Schlierenoptik sichtbar gemacht werden. Man bezeichnet diese Form der Elektrophorese als " Freie Elektrophorese " und unterscheidet sie von den Zonenelektrophoresen. Bei den letzteren führt die zu trennende Phase zwar ebenfalls eine relative Bewegung zu einer flüssigen Phase aus, jedoch liegt hier die flüssige Phase nicht " frei " vor, wie im NERNST'schen U-Rohr, sondern sie füllt die Poren eines festen porösen Systems aus. Dieses poröse System ist unbeweglich und stellt den Träger der Elektrophorese dar. Trägerelektrophorese und Zonenelektrophorese sind also identische Begriffe. Durch Einführung dieser dritten Phase sind natürlich gegenüber der Freien Elektrophorese mit nur zwei Phasen Zusatzeffekte zu erwarten.

Die folgende theoretische Betrachtung der Elektrophorese beschreibt daher zuerst die allen Elektrophoreseformen gemeinsamen Gesetzmäßigkeiten an Hand der Freien Elek-

trophorese und diskutiert dann erst die Zusatzeffekte, welche bei den Zonenelektrophoresen in festen porösen Systemen auftreten.

II. Die Theorie der Freien Elektrophorese.

Die Theorie der Freien Elektrophorese stellt den mathematischen Zusammenhang zwischen der Wanderungsgeschwindigkeit des Teilchens einerseits und seinen hydrodynamischen und elektrischen Eigenschaften sowie dem äußeren elektrischen Feld andererseits dar. Im folgenden wird dieser Zusammenhang zwischen der Wanderungsgeschwindigkeit und den übrigen Größen auf zwei verschiedenen Wegen abgeleitet:

1. Wir gehen von der Annahme aus, daß die feste Phase in der flüssigen Phase suspendiert ist. Die Dicke der auftretenden elektrischen Doppelschicht soll klein sein gegenüber dem Krümmungsradius des Teilchens in jedem Punkt seiner Oberfläche. Ein der festen Phase unmittelbar benachbarter Teil der Schicht entgegengesetzter Ladung ist immobil; die übrigen Ionen entgegengesetzten Vorzeichens bilden einen Anteil, der sich aufgrund der thermischen Bewegung der Ionen diffus in die Lösung erstreckt. Der festen Phase ordnen wir das Potential Ψ_0 zu, der immobilen Schicht das Zetapotential. Mit wachsendem Abstand von der festen Phase wird das Potential Ψ_0 dem Wert Null zustreben. Über

das Profil des Potentialverlaufs sind verschiedene Vorstellungen entwickelt worden, die mit den Namen HELMHOLTZ, GOUY und STERN verknüpft sind.

Die flüssige Phase ist also der festen Phase entgegengesetzt geladen. Nach Anlegen eines elektrischen Feldes bewegt sich die suspendierte Phase relativ zu der flüssigen Phase. Diese Bewegung unterliegt dem Stationaritätsprinzip: die an den Ladungen angreifende elektrische Feldstärke erzeugt eine Kraft, die der hydrodynamischen Reibungskraft entgegengesetzt gleich ist. Mit Hilfe des NEWTON'schen Ansatzes läßt sich

$$d\left[\eta \frac{dv}{dx}\right] + \varrho E\, dx = 0 \qquad (1.)$$

formulieren.

In Gleichung 1: η = Viskosität

v = Wanderungsgeschwindigkeit

x = Entfernung

ϱ = Raumladungsdichte

E = elektrische Feldstärke

Die Lösung dieser Differentialgleichung - unter Berücksichtigung der immobilen Schicht und des damit verbundenen Potentials - lautet

$$v\,(x=\infty) = -\frac{D \cdot \xi \cdot E}{4 \cdot \pi \cdot \eta} \qquad (2.)$$

wobei D = Dielektrizitätskonstante

ξ = Potential der immobilen Schicht

x = Abstand von der festen Phase

Die Wanderungsgeschwindigkeit (v) der Teilchen ist also außer von ihrer Eigenladung (e) abhängig von der Größe der angelegten Feldstärke (E), der Viskosität η des umgebenden Mediums, der Dielektrizitätskonstanten (D) des Mediums und dem Zetapotential. Außer der Feldstärke und der Eigenladung sind also nur die Eigenschaften des umgebenden flüssigen Mediums entscheidend; letztere sind von der ionalen Zusammensetzung bestimmt.

2. Es wird angenommen, daß das geladene Teilchen ein Makroion ist. Für den besonderen Fall des Proteins ist die Entstehung der Ladung des Makroions durch die Dissoziation reaktiver Gruppen gegeben; diese Gruppen sind die Carboxylgruppe, die α - und ε - Aminogruppe, die OH-Gruppe der aromatischen Aminosäuren sowie das reaktive Stickstoffatom des Imidazolringes. Aufgrund der Dissoziation dieser Gruppen kann in Abhängigkeit vom pH-Wert die Ladung der Proteine in Größe und Vorzeichen verschieden sein. Bei einem pH-Wert von 8,6 - wie er bei der Elektrophorese der Serumproteine gewählt wird - liegen die Serumproteine als Polyanionen vor.

Es ist zulässig, kompakte Proteinmoleküle in hydrodynamischen Theorien durch Äquivalentkugeln mit dem

Radius r zu beschreiben. Ihr hydrodynamisches Verhalten ist dann durch das STOKE'sche Gesetz gegeben:

$$K = 6\pi\eta_0 rv$$

wobei η_0 = Viskositätskonstante

r = Radius der Äquivalentkugeln

v = Wanderungsgeschwindigkeit

Unter Anwendung des Stationaritätsprinzips ergibt sich für die Wanderungsgeschwindigkeit in einem elektrischen Feld

$$v = -\frac{n\,e\,E}{6\pi\eta_0\,r} \qquad (3.)$$

In Gleichung 3: n = Anzahl der Teilchen

e = Eigenladung des Teilchens

E = Feldstärke

η_0 = Viskositätskonstante

r = Radius der Äquivalentkugeln

Diese Gleichung ist nur gültig für den Grenzfall unendlicher Verdünnung der gelösten Makroionen - Proteine - bei Abwesenheit von Salzen. Bei endlichen Proteinkonzentrationen und der Gegenwart anderer Elektrolyte müssen mehrere zusätzlich auftretende Effekte berücksichtigt werden:

Um das Teilchen baut sich eine Ionenwolke entgegengesetzten Vorzeichens auf, die aus einer relativ immobilen und einer beweglichen Schicht besteht. Der immobile Teil dieser Ionenschicht besitzt eine der Ladung des Makroions entgegengesetzte Ladung und verringert also den Einfluß von n · e. Die Ladung, die sich aus

der des Makroions und der der immobilen Schicht zusammensetzt ist die effektive Ladung Δe. Außerdem ist der Radius dann nicht mehr durch r, sondern durch r + d gegeben, wobei d gleich der Dicke der immobilen Schicht ist. Gleichung 3 nimmt dann folgende Form an:

$$v = \frac{\Delta e \cdot E}{6 \pi \eta \cdot (r + d)} \qquad (4.)$$

In Gleichung 4 ist Δe = Summe der Ladungen von Äquivalentkugel plus immobiler Schicht

E = Feldstärke

r = Radius der Äquivalentkugel

d = Dicke der immobilen Schicht

Das Zetapotential wird hier eingeführt, indem man das Teilchen gemeinsam mit seiner immobilen Schicht als Kugelkondensator auffaßt, dessen Kapazität gegeben ist durch

$$C = \frac{\Delta e}{\xi} \qquad \text{und} \qquad C = D \cdot (r + d)$$

wobei D = Dielektrizitätskonstante.

Durch Kombination mit Gleichung 4 ergibt sich

$$V = \frac{D \cdot \xi \cdot E}{6 \pi \eta} \qquad (5.)$$

Die Gleichungen 2 und 5 unterscheiden sich durch die Faktoren 1/4 und 1/6. Beide Gleichungen lassen sich nach HÜCKEL auf die allgemeine Form

$$v = f \frac{D \cdot \xi \cdot E}{\pi \cdot \eta} \qquad (6.)$$

bringen. Dieser Faktor f hängt von der Dicke der Doppelschicht und der Gestalt der Teilchen ab (14). Er nimmt bei dünner Doppelschicht und hoher ionaler Konzentration bei beliebiger Gestalt des Teilchens den Wert 1/4 an. Der Wert 1/6 gilt für kugelförmige Teilchen bei dicker Doppelschicht und kleiner ionaler Konzentration.

Gleichung 3 wird weiterhin modifiziert, um den Effekt der Relaxation zu berücksichtigen: das Teilchen bewegt sich aufgrund seiner gerichteten Bewegung in der Elektrophorese durch die Doppelschicht hindurch. Diese wird dadurch durchbrochen und muß vor dem Teilchen immer wieder neu aufgebaut werden. Dieser Effekt wird durch die Korrekturfunktion f ($xa\xi$) erfaßt:

$$v = \frac{D \cdot \xi \cdot E}{6 \pi \eta} f (xa\xi) \qquad (7.)$$

In Gleichung 7 ist: $a = r + d$

$1/x$ = " Dicke der Doppelschicht "

Wie Gleichung 7 zeigt, hängt das Zetapotential in komplizierter Weise mit der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit zusammen; es dürfte also schwierig sein, aus Messungen der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit das Zetapotential zu bestimmen.

In den Gleichungen 2, 5, 7 wird die Geschwindigkeit als Funktion der hydrodynamischen und elektrischen Eigenschaften des Teilchens und der Feldstärke diskutiert.

Die Geschwindigkeit v läßt sich normieren, indem man sie auf die Einheit der Feldstärke E bezieht. Man bezeichnet diese Größe v/E als elektrophoretische Beweglichkeit U.

$$U = \frac{v}{E}$$

Diese Größe hängt nur noch von den hydrodynamischen und elektrischen Eigenschaften des Teilchens (Proteinmolekül) ab.

Zusammenfassend sieht man, daß gemäß Gleichung 2 - 7 im wesentlichen folgende Faktoren die Wanderungsgeschwindigkeit in der Elektrophorese beeinflussen:

1. Feldstärke
2. Viskosität der Lösungsmittel
3. pH der flüssigen Phase (Puffer)
4. Ionenstärke des Puffers
5. Molekulare Größe des Teilchens.

Diese physikalischen Faktoren sind auch bei der Zonenelektrophorese wirksam, sie sind es aber nicht ausschließlich, da - wie oben erwähnt - die Einführung einer weiteren Phase Zusatzeffekte verursacht.

III. Die Besonderheiten der Elektrophorese in festen, porösen Systemen (Zonen-und Trägerelektrophorese).

Man hat die Träger eingeführt, um die bei der Freien Elektrophorese allfälligen mechanischen und thermischen Störungen (Konvektion) einzuschränken. Der Träger ist in der Regel ein poröses System in der Form eines Streifens; bekannt sind Zellulose, Agar, Stärke, Stärkegel, Polyacrylamid. Die flüssige Phase durchdringt dieses System. Das zu trennende Proteingemisch wird auf einer schmalen Linie senkrecht zur Längsrichtung des Streifens aufgetragen. Die Feldlinien des äußeren elektrischen Feldes verlaufen in Richtung des Streifens,

Bei den Trägerelektrophoresen ist es prinzipiell möglich, die Fraktionen mit unterschiedlicher elektrophoretischer Beweglichkeit vollkommen voneinander als Zonen oder Banden zu trennen. Nach der elektrophoretischen Wanderung bleiben sie in dieser getrennten Form auf dem Träger liegen. Die Streifen können gefärbt und quantitativ ausgewertet werden.

Die Trägerelektrophoresen sind Mikromethoden (sie trennen Proteinmengen bis 1 mg), die Freie Elektrophorese ist eine Makromethode (mehr als o,1 g) bzw. eine Halbmikromethode (sie trennt in der Größenordnung von 1o mg).

Durch die Einführung von Trägern ergeben sich folgende Zusatzeffekte:

1. Adsorption: aktive Zentren an der Trägeroberfläche (z.B. ionisierte Carboxylgruppen) bedingen Wechselwirkungen zwischen Trägeroberfläche und wandernden Teilchen. Diese Wechselwirkungen werden unter dem Begriff der Adsorption zusammengefaßt; hierdurch wird ein Teil der Fraktion der elektrophoretischen Wanderung entzogen. Dieser Anteil wird durch die Desorption bei fallender Konzentration der weiterwandernden Bande wieder für die elektrophoretische Wanderung frei. Durch diesen Vorgang wird das Konzentrationsprofil der Bande geändert: der Konzentrationsgradient der Vorderfront der Bande wird steiler, der Konzentrationsgradient der Hinterfront der Bande wird abgeflacht.

2. Sogeffekte: ungleichmäßige Flüssigkeitsverteilung im Elektrophoresemedium beeinträchtigt die idealen Elektrophoresebedingungen. Die ungleichmäßige Flüssigkeitsverteilung kann erstens durch die Inhomogenität des Trägermaterials und zweitens durch die Verdunstung entstehen. Die Folge dieser Sogeffekte sind unregelmäßige Bandenverschmierungen.

3. Diffusion: unter der Diffusion versteht man die Überführung von gelösten Substanzen von Orten höherer Konzentration zu Orten niederer Konzentration. Sie er-

folgt spontan und beruht auf der BROWN'schen Molekularbewegung. Für die pro Zeiteinheit und Flächeneinheit transportierte Zahl von Molekülen sind der Diffusionskoeffizient und der Konzentrationsgradient bestimmend. Die Diffusion wirkt sich in der Zonenelektrophorese in einer Bandenverbreiterung aus. Diese kann durch eine Herabsetzung der Laufzeit eingeschränkt werden.

4. Elektroosmose: die oben definierte Erscheinung der Elektroosmose muß auch bei allen Elektrophoresen in heterogenen Medien auftreten. Ihre Ursache ist in diesem Fall das Potential zwischen polaren Gruppen des Trägers und der Pufferlösung als flüssiger Phase (Zetapotential). Die bei der Elektrophorese der Serumproteine gebräuchlichen Pufferlösungen von pH 8,6 laden sich gegenüber dem Träger positiv auf. Die wässerige Phase wandert also zur Kathode. Diese Bewegung ist demnach der Proteinbewegung entgegengerichtet. Das Ausmaß der Elektroosmose kann mit Hilfe von gefärbtem Dextran oder nicht ionisierten Farbstoffen festgestellt werden.

5. Elektrodecantation: dieser Effekt tritt bei Trägern auf, die zusätzlich eine molekulare Siebung bewirken. Voraussetzung ist, daß an irgendeiner Stelle des Trägers die Bedingungen der Freien Elektrophorese herrschen, d.h. der feste poröse Körper muß auf einer kleinen Strecke (Größenordnung von 1 mm) unterbrochen

sein und durch eine Flüssigkeitsbrücke weitergeführt werden. In diesem Falle wird das heterogene System durch einen homogenen Bereich unterbrochen; auf der kurzen Zwischenstrecke herrscht eine erhöhte elektrophoretische Beweglichkeit der Teilchen, welche beim Wiedereintritt in den Träger reduziert wird. Dadurch kommt es am Ende der Zwischenstrecke zu einer Flüssigkeitsschicht erhöhter Dichte, die sich der Schwerkraft folgend absetzt. Dieser Effekt kann sich günstig oder nachteilig auf die Trennung auswirken. Vor allem bei der Einfülltechnik der Stärkegelelektrophorese ist dieser Effekt zu beachten (s. unter A. V.).

6. Zonenimperfektion: alle Unregelmäßigkeiten einer Bande können unter dem Begriff Zonenimperfektion zusammengefaßt werden. Auftretende Unregelmäßigkeiten können teilweise auf die oben genannten Effekte zurückgeführt werden; außerdem müssen aber auch Temperaturunterschiede im Träger und Konzentrationsgradienten der Elektrolyte der Puffer berücksichtigt werden.

IV. Die Theorie der Stärkegelelektrophorese.

Unter der Vielzahl der oben genannten Träger zeigt das Stärkegel die geringsten Wechselwirkungen mit den zu trennenden Proteinfraktionen. Außerdem hat das Stärkegel die Eigenschaft, die zu trennenden Moleküle zu sieben - eine Eigenschaft, welche die anderen Träger nicht haben (in der Regel trennen die Zonenelektrophoresen ebenso wie die Freie Elektrophorese nur nach dem Kriterium der elektrophoretischen Beweglichkeit). Die Stärkegelelektrophorese trennt also die Proteine sowohl nach dem Kriterium der normalen Zonenelektrophorese als auch nach dem Kriterium der Gelfiltration.

O. SMITHIES hat als erster einen Versuch unternommen, den Wanderungsmechanismus von Proteinen bei der Stärkegelelektrophorese zu erklären. Er nimmt an, daß das Stärkegel ein dreidimensionales Netzwerk von ineinander verknäulten Polysaccharidketten bildet. Der Abstand zweier Ketten innerhalb der Gelmatrix hängt von der Konzentration der Ketten in der Volumeneinheit ab; diese ist gegeben durch die Konzentration des Stärkegels. Das Netzwerk bildet kein starres System von Ketten, sondern jede Kette unterliegt der BROWN'schen Molekularbewegung. Dadurch entsteht im Gel ein Porensystem, dessen Porenweite in jedem Zeitmoment variiert. Proteine mit kleiner molekularer Größe werden also im zeitlichen Mittel eine geringere sterische Behinderung erfahren als Pro-

teine mit größerer Molekülgröße. Der Grad der Verzögerung der Wanderung muß aufgrund dieser Modellvorstellung erstens mit wachsender Gelkonzentration, zweitens mit steigender Molekülgröße der zu trennenden Proteine und drittens mit fallender Temperatur zunehmen.

Ein Beispiel für die Behinderung der Wanderung in Abhängigkeit von der Molekülgröße wird von SMITHIES (29) gegeben. Er zeigte, daß Beta-Lipoprotein, Transferrin und Hämoglobin trotz gleicher elektrophoretischer Beweglichkeit in der Papierelektrophorese bei gleichem pH von 8,6 in der Stärkegelelektrophorese verschiedene Beweglichkeiten aufweisen. Die Beweglichkeiten verhalten sich wie o,14 : o,88 : 1,o - die Molekulargewichte verhalten sich wie 2o : 1,4 : 1. Man erkennt, daß die elektrophoretische Beweglichkeit in der Stärkegelelektrophorese in erster Näherung der Molekülgröße umgekehrt Proportional ist.

Das makroskopische Verhalten der Proteine in der Stärkegelelektrophorese beschreibt SMITHIES durch folgende Gleichung

$$m = a + \frac{b}{s} \qquad (1a)$$

In Gleichung 1a ist m = Wanderung (mm)

s = Stärkegelkonzentration g/1oo ml Puffer

a und b sind Konstanten.

Der experimentell erfaßbare Bereich dieser linearen Beziehung zwischen Wanderung und reziproker Stärkegelkonzentration wird durch die mechanischen Eigenschaften des Gels wesenrlich eingeschränkt. Messungen der Wanderung eines Proteins in Abhängigkeit von der Stärkegelkonzentration bei sonst konstanten Parametern sind nur in einem Konzentrationsbereich zwischen 1o g/1oo ml und 16 g/1oo ml möglich. (Abb. 1.)

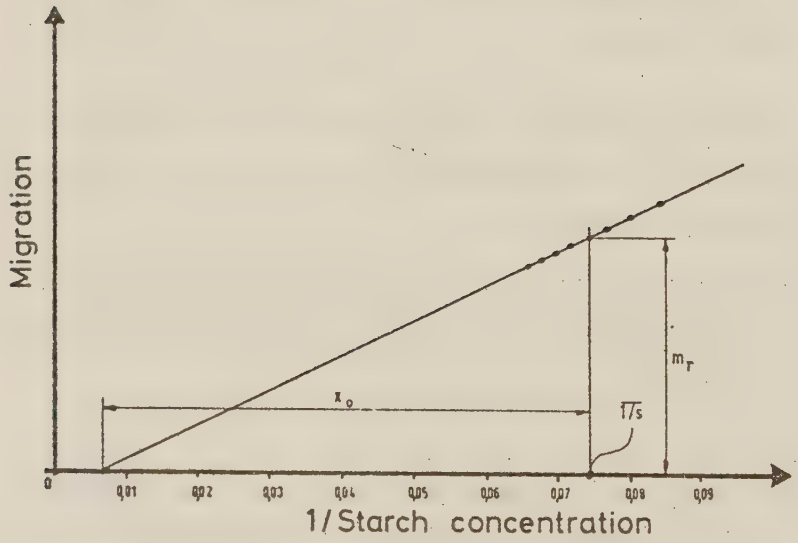


Abb. 1. Graphische Darstellung der Abhängigkeit der Wanderung von der Gelkonzentration nach SMITHIES (29).

Legende zu Abb. 1. : Der Schnittpunkt der Geraden mit der Abszisse ergibt eine reziproke Stärkegelkonzentration, bei der der Wanderung der Betrag Null zukäme. Die durch diesen Schnittpunkt gewonnene Stärkegelkonzentration s_o wird als Grenzkonzentration bezeichnet. Im experimentell erfaßbaren Bereich werden für die normalen Serumproteine die Grenzkonzentrationen nicht erreicht; dies ist aber der Fall für die pathologischen Makroglobuline, welche also in der Stärkegelelektrophorese nicht wandern. Im Sinne des oben diskutierten Modells bedeutet dies, daß der mittlere Porenradius bei der durch Extrapolation ermittelten Grenzkonzentration s_o kleiner ist als der Äquivalentradius des untersuchten Eiweißmoleküls. Für jede molekulare Größe der Proteine muß unter Annahme der Gültigkeit der Geraden die Grenzkonzentration durch Extrapolation zu errechnen sein. Die so ermittelte Gelkonzentration muß in einfacher Weise von der Molekülgröße der betrachteten Eiweiße abhängen. SMITHIES prüfte an einer Reihe von Proteinmolekülen den Zusammenhang zwischen dem Molekulargewicht M und der extrapolierten reziproken Gelkonzentration. Er fand unter anderem, daß die Ladung des Ions, der pH-Wert des Puffers, die angelegte Spannung und die Elektrophoresedauer den Grenzwert der reziproken Gelkonzentration nicht beeinflussen. Er konnte zeigen, daß zwischen dem Molekulargewicht M und der reziproken Gelkonzentration eine Proportionalität

besteht: $M \sim \frac{1}{s_o}$ (2.)

Diese Proportionalität steht in Einklang mit der obigen Modellvorstellung, daß mit steigendem M erst geringere Gelkonzentrationen eine weniger behinderte Passage möglich machen. Umfassende systematische Untersuchungen zur Prüfung dieser Proportionalität stehen noch aus.

SMITHIES führte zur Charakterisierung des Verhaltens einzelner Proteine den Retardationskoeffizienten r ein. Er definierte ihn wie folgt:

$$r = \frac{\Delta \; m}{\bar{m} \; \Delta \left(\frac{1}{s}\right)} \qquad (3.)$$

In Gleichung 3 ist Δ m = Veränderung der Wanderung pro Einheit der reziproken Gelkonzentration, bezogen auf die mittlere Wanderung m.

$\bar{m}$ = mittlere Wanderung.

Die mittlere Wanderung wird im Experiment durch Mittlung über sämtliche Wanderungen in den Gelstreifen verschiedener Gelkonzentrationen bestimmt.

In Kombination mit Gleichung 1a ergibt sich

$$b = \frac{\Delta \; m}{\Delta \left(\frac{1}{s}\right)} \qquad (4a)$$

und

$$r = \frac{b}{\bar{m}} \qquad (4b)$$

Der Autor nimmt an, daß der so definierte Retardationskoeffizient dem Molekulargewicht proportional ist. In der bis jetzt vorliegenden Untersuchung (29) wird dieses Verhalten durch das Experiment bestätigt. Da in den Retardationskoeffizienten sowohl die Steigung b der Geraden als auch die Wanderung eingehen, kann diese Größe im Gegensatz zur Grenzkonzentration s_o nicht in einfacher Weise von der molekularen Größe abhängen. Sie muß in komplizierter Weise sowohl von der effektiven Ladung als auch von der molekularen Größe und der Gelkonzentration abhängen. Die experimentelle Ermittlung des Retardationskoeffizienten wird in folgender Weise ausgeführt:
Die Wanderung eines bestimmtem Proteins wird in Abhängigkeit von der Gelkonzentration ermittelt. Durch Anwendung von Gleichung 1 läßt sich sodann der Wert der konstanten b angeben. Durch die Mittlung über sämtliche Wanderungen in den Gelstreifen verschiedener Gelkonzentration wird m bestimmt. Damit sind alle Größen, die nach Gleichung 4 zur Ermittlung von r notwendig sind, gegeben.

Der Einfluß der Veränderung der Gelkonzentration auf die Wanderungsgeschwindigkeit läßt sich durch folgende Differentiation der Gleichung 1 zeigen:

$$\frac{dm}{ds} = -\frac{b}{s^2} \qquad (1b)$$

In der Form des Differenzenquotienten

$$\frac{\Delta m}{\Delta s} = - \frac{b}{s^2} \qquad (1c)$$

Da für die Betrachtung nur die Beträge der Schwankungen maßgebend sind, geht Gleichung 1c in die Form

$$|\Delta m| = \frac{b}{s^2} |\Delta s|$$

über.

Nachdem in den vorangehenden Abschnitten die elektrophoretische Beweglichkeit definiert und ihre Abhängigkeit von den verschiedenen physikalischen Größen diskutiert wurde, soll die folgende Tabelle von PUTNAM (19) über die genauen Zahlenwerte der oben genannten Größen informieren.

PROTEIN	u	M	pI	D	V
Präalbumin	9,o	61 ooo	-	-	-
Albumin	6,o	69 ooo	4,7	6,1	o,733
Glycoprotein	5,1	44 1oo	2,7	5,27	o,675
Haptoglobin 1 - 1	-	85 ooo	4,1	4,8	o,72
Globulin	4,o	-	-	-	o,693
Makroglobulin	4,2	82o ooo	5,4	2,41	-
Coeruloplasmin	-	151 ooo	4,4	-	-
Globulin	-	93 ooo	-	-	o,725
Transferrin	3,1	89 ooo	5,9	6,2	o,725
Fibrinogen	2,1	341 ooo	5,8	1.97	o,723

u: elektrophoretische Beweglichkeit in $1o^{-5}$ cm^2/volt/sec (bestimmt mit einem Veronalpuffer von einem pH von 8,6 und einer Ionenstärke von o,1.

M: Molekulargewicht

pI: isoelektrischer Punkt

D: Diffusionskonstante in Fick-Einheiten ($1o^{-7}cm^2$/sec) bezogen auf Wasser bei 2o ° C.

V: partielles spezifisches Volumen des Proteins - meist bei 2o ° C.

(Tabelle aufgestellt nach PUTNAM (19.))

V. Methode nach O. SMITHIES.

Die von SMITHIES 1955 beschriebene Stärkegelelektrophorese stellt die Grundlage für die zahlreichen Arbeiten mit dieser Methode dar.

Prinzip: man bereitet ein Gel aus einer gereinigten Kartoffelstärke und dem gewählten Puffer; dieses wird in eine flache Spezialwanne gegossen und abgekühlt. Die Elektrophorese wird in dieser Wanne ausgeführt. Das zu trennende Proteingemisch wird in Gelschlitze eingebracht. Mit Pufferlösung getränkte Filterpapierbrücken stellen die Verbindung zwischen Gel und Elektrodenkammern dar und garantieren für die Dauer der Elektrophorese eine leitende Verbindung zur Gleichspannung. SMITHIES hat zwei Formen der Anordnung der Gelkammer beschrieben: eine horizontale und eine vertikale Stärkegelelektrophorese (s. Abb. 2. und 3.).

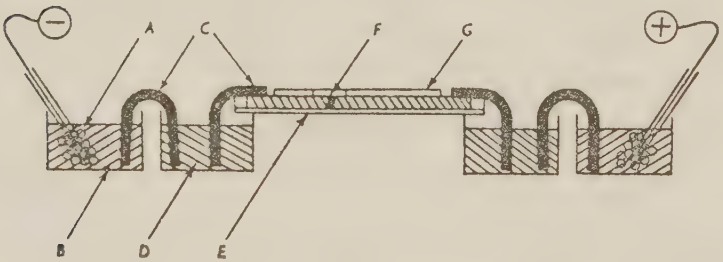


Fig. 1. General layout of apparatus. *A*, Ag/AgCl electrode; *B*, concentrated NaCl solution in electrode compartment; *C*, filter-paper bridges soaked in bridge solution; *D*, compartment containing bridge solution; *E*, starch gel contained in plastic tray; *F*, position of sample insertion; *G*, seal to prevent loss of water during electrophoresis.

Abb. 2. Anordnung der horizontalen SGE nach SMITHIES (24).

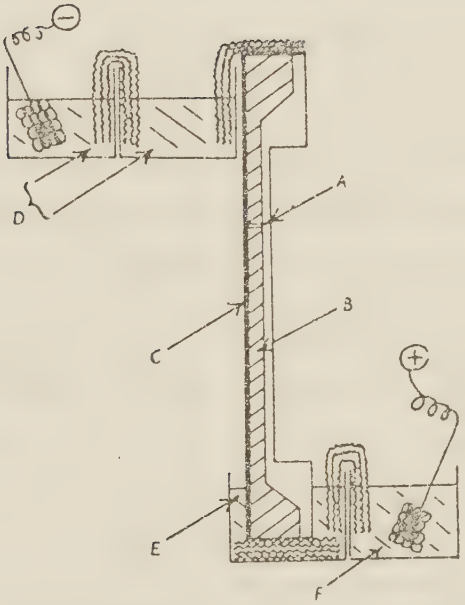


Fig. 3. Experimental arrangement for vertical starch-gel electrophoresis. *A*, position of sample slots; *B*, gel; *C*, petroleum jelly seal; *D*, trays containing bridge solution (0·3M-boric acid, 0·06M-NaOH). The negative reversible Ag/AgCl electrode is in the outer tray. *E*, Tray containing bridge solution with approx. 10 thicknesses of filter paper at the bottom, on which the end of the gel rests. *F*, Tray containing concentrated NaCl soln. (approx. 10%, w/v) for the positive reversible Ag/AgCl electrode. The zig-zag lines in the figure show the positions of thick filter-paper bridges.

Abb. 3. Anordnung der vertikalen Form der SGE nach SMITHIES (27).

Das Stärkegel: SMITHIES benutzt zur Bereitung des Gels eine Stärke, die er folgendermaßen reinigt: 3oo g einer im Handel erhältlichen Kartoffelstärke werden bei + 38,5°C

in einem Salzsäure-Aceton-Gemisch suspendiert; auf eine Volumeneinheit konzentrierter HCl kommen 1oo Einheiten Aceton. Ohne zu rühren wird diese Suspension 45 Minuten stehen gelassen, sodann wird durch Zugabe von 15o ml Natriumacetat die Säureeinwirkung gestoppt. Man filtriert die Stärke ab und wäscht sie sorgfältig mit destilliertem Wasser aus; um auch letzte Acetatreste zu beseitigen, läßt man die Stärke über Nacht nochmals in destilliertem Wasser stehen und filtriert sie am nächsten Tag wiederum ab. Abschließend wird die Stärke mit Aceton entwässert und bei 45^{o} - $5o^{o}$ C getrocknet.

SMITHIES betont die Wichtigkeit von Stärkechargen mit konstanten Eigenschaften für die Reproduzierbarkeit der Elektrophoresen; wenn Firmenpräparate verwendet werden, müssen sie dem beschriebenen Reinheitsgrad entsprechen.

Als Gelpuffer wählt SMITHIES in der Originalarbeit eine Borsäure-NaOH-Lösung, welche für die Serumelektrophorese auf einen pH-Wert von 8,6 eingestellt wird. In späteren Arbeiten übernimmt der Autor einen von POULIK (17) eingeführten Trishydroxymethylaminomethan-Citronensäure-Puffer vom gleichen pH-Wert. Das Gel selbst erlaubt Puffer-pH-Werte in einem Bereich von pH 2 bis pH 12.

Eine Konzentration von 1o - 16 g Stärke auf 1oo ml Puffer ergibt Gele, die den mechanischen Anforderungen während der Behandlung der Stärkegelelektrophorese am besten genügen. SMITHIES gibt folgende Anweisung zur Gelbereitung: die abgewogene Stärkemenge wird zusammen mit der zugehörigen Puffermenge in einen Erlenmeyerkolben gegeben; unter gleichmäßigem und festem Schütteln wird die Lösung über der Bunsenflamme erhitzt. Kurz vor Siedebeginn bricht man den Kochvorgang ab - die Lösung hat nun einen zähflüssigen Zustand angenommen. Man soll auch nach dem Erhitzen das Gel weiter kräftig schütteln, um die ganze Gelmasse auf einer gleichmäßigen Temperatur zu halten. Anschließend wird das Gel im Wasserstrahlpumpenvakuum entgast, es gerät dabei in heftiges Sieden.

Wannen: das heiße und blasenfreie Gel wird in eine Plastikwanne gegossen, in welcher es unter dem Druck eines Deckels zu einer ebenen Platte geformt wird. Die von SMITHIES entwickelten Wannen unterscheiden sich bei der vertikalen und horizontalen Form der Methode. Für die horizontale Stärkegelelektrophorese genügt eine Plastikplatte mit einem aufgeklebten Rahmen, dessen Innenmaße nach SMITHIES 6,5 X 25o X 2o mm betragen sollen. Den Grundtyp der für die vertikale Form der Methode entworfenen Wanne zeigt Abb. 4. Auffälligster Unterschied sind die Vertiefungen der Wanne an den Stirnseiten; die Breite von 12,12 cm ermöglicht die

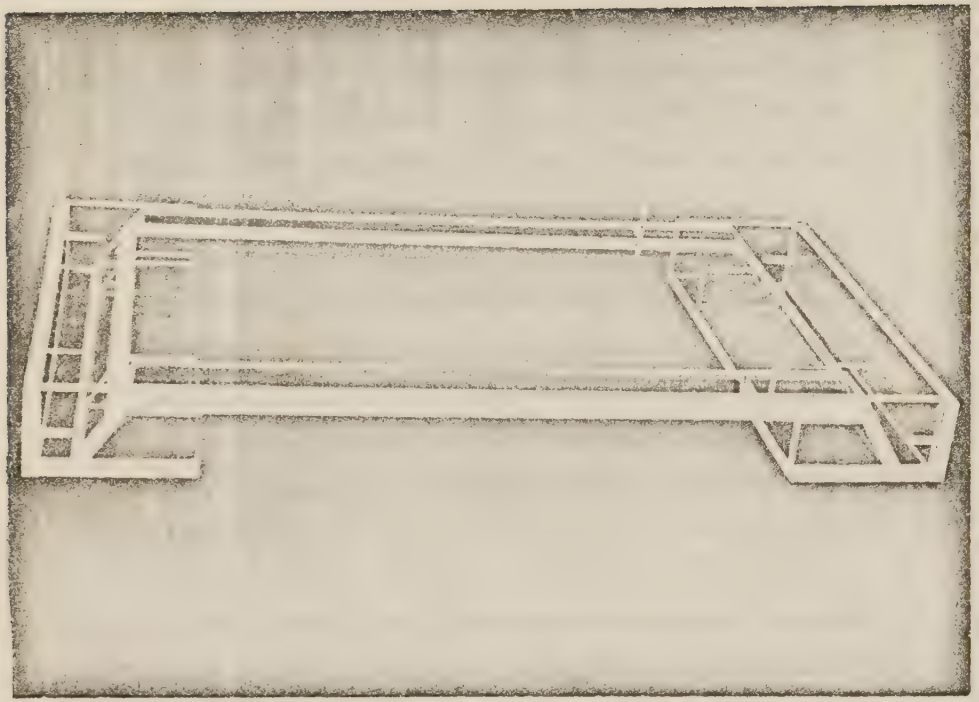


Abb. 4. Wanne zur Durchführung der SGE nach SMITHIES - vertikale Form. Eigene Herstellung.

Gleichzeitige Auftrennung von 6 - 8 Seren. Die Stirnwände der Kammer sind abnehmbar. Beide von SMITHIES beschriebenen Wannen formen Gelplatten von 6,5 mm Dicke.

Einfüllen des Serums: das Serum wird bei der Stärkegelelektrophorese nicht aufgetragen wie bei den anderen Formen der Zonenelektrophorese, sondern in das Gel eingefüllt. SMITHIES hat im Verlaufe seiner Arbeiten dazu

drei Techniken beschrieben:
Nach der ersten Methode wird nach Entfernen des Deckels ein schmaler, senkrechter Schlitz in die Gelplatte geschnitten und in diesen ein mit Serum getränktes Filterpapier eingesteckt. Nach den Beobachtungen des Autors hat diese Methode zwei wesentliche Nachteile: erstens verursacht die fibröse Struktur des Papiers an den langsamen Banden des Pherogramms starke Unregelmäßigkeiten und zweitens läßt die Adsorption am Papier die Auftrennung mancher Proteine nicht zu (z.B. Haptoglobine).

Diese Schwierigkeiten werden von der zweiten Methode überwunden; danach werden die Schlitze in der gleichen Weise angefertigt wie in der ersten Methode, sodann wird das Serum aber mit aufgeschwemmten Stärkekörnern in diese Schlitze eingefüllt. Bei dieser Methode beschreibt der Autor die Schwierigkeit, stets ein gleiches Einfüllvolumen zu erreichen. Außer dieser mangelnden Reproduzierbarkeit machen sich Querschnittsverschiebungen unangenehm bemerkbar.

Bei der dritten Methode wird das Serum ohne eine Trägersubstanz einpipettiert; diese Methode konnte der Autor aber nicht für die zunächst entwickelte horizontale SGE verwenden, denn dabei macht sich der oben beschriebene Effekt der Elektrodecantation bemerkbar. Die ungünstige Auswirkung der Elektrodecantation bei der horizontalen SGE war der eigentliche Anlaß für die

vertikale Anordnung des Stärkegels. In der vertikalen Modifikation wirkt sich die ED günstig aus. Der Effekt der ED bei der horizontalen SGE ist folgendermaßen zu charakterisieren: in dem mit Serum gefüllten vertikalen Schlitz einer horizontalen Gelplatte kommt es nach Anlegen eines elektrischen Potentials zu einer Konzentration der Proteine an der anodischen Seite des Schlitzes. Wie oben dargelegt, beruht dies darauf, daß auf der kurzen Strecke des Schlitzes die elektrophoretische Beweglichkeit größer ist als im Gel. Die Albumine erreichen dabei die Anodenseite des Schlitzes als erste, die Gammaglobuline als letzte. Wegen der hohen Konzentration in diesem Flüssigkeitsbereich folgen die Eiweißkörper der Schwerkraft und setzen sich am Boden ab; dabei kommen die Albumine am Boden zu liegen, weil sie als erste das Konzentrationsmaximum erreicht haben. Die langsameren Moleküle liegen in etwas höheren Schichten. Daraus wird verständlich, daß nach der Elektrophorese die schneller wandernden Proteine auf der Unterseite des Gels stärkere Banden zeichnen, während die langsamen auf der Oberseite am stärksten ausgeprägt sind. Keine Gelschicht repräsentiert die wahre prozentuale Verteilung der Proteine im Serum. Der Effekt der ED läßt sich positiv ausnutzen, wenn es gelingt, den Vektor des elektrischen Feldes in Richtung der Schwerkraft anzuordnen. Es ergibt sich dann eine wünschenswerte Zusammendrängung der Zonenbreite.

Gleichzeitig beschreibt SMITHIES (27) folgende apparative Neuerungen, mit deren Hilfe es gelingt, eine relativ konstante Schlitzform zu reproduzieren: Kernstück ist ein Kamm, wie ihn Abb. 5. zeigt.

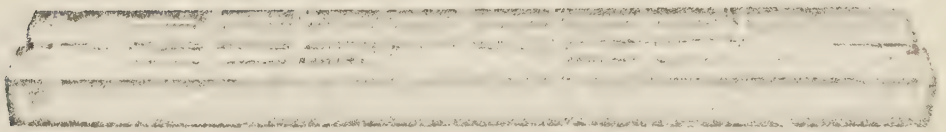


Abb. 5. Kamm zur Durchführung der vertikalen Form der SGE nach SMITHIES (27). Eigene Herstellung.

Der Kamm ist in rechtem Winkel zu der Deckelunterfläche befestigt und wird daher beim Aufsetzen des Deckels in das noch heiße Gel eingedrückt. Nach dem Erkalten hinterläßt er im Gel acht gleichmäßig geformte Schlitze. Um nun den Kamm ohne Drehung aus dem Gel ziehen zu können, hat SMITHIES den Deckel in zwei ungleich große Platten geteilt und den Kamm mit Schrauben zwischen die berührenden Kanten eingeklemmt; nach Lösung der Schrauben lassen sich dann Deckel und Kamm getrennt

voneinander vom Gel entfernen. Geloberfläche und Einfüllstellen werden mit einer Schicht aus einem leicht schmelzbaren Paraffin versiegelt. In dieser Form wird das Stärkegel in der Elektrophorese verwandt; die jeweilige Anordnung ist aus den Abb. 3. und 4. ersichtlich.

Anfärben der Banden: zur Anfärbung der Serumproteine empfiehlt SMITHIES (24) eine gesättigte Lösung von Amidoschwarz 10 B in Methanol-Eisessig-Wasser. Mit der beschriebenen Technik ergibt eine Anfärbung der Mittelschicht des Gels die besten Pherogramme. Dazu schneidet man das 6,5 mm dicke Gel in einer Höhe von 3 mm parallel zur größten Fläche und erhält zwei dünne Platten, deren Schnittflächen mit der beschriebenen Färbelösung übergossen werden. Zur Entfärbung des Gels benutzt man die reine Methanol-Eisessig-Wasser-Lösung.

B. P R O B L E M S T E L L U N G

Die Einleitung hat dargelegt, warum die Trennung der Plasmaproteine durch die Stärkegelelektrophorese sich grundlegend von den bei den anderen Elektrophoresearten (Papier, Agar, Acetat, Stärkekorn) erzielten Trennungen unterscheiden muß. Für die Klinik kann die mit der Stärkegelelektrophorese erreichbare Trennung eine Erweiterung der diagnostischen Möglichkeiten bedeuten, ohne daß die bewährten Elektrophoresemethoden ihre Bedeutung verlieren.

Trotz der zahlreichen Untersuchungen, welche seit Einführung der Methode die Stärkegelelektrophorese mit beachtlichem Erfolg benutzen, hat die stärkegelelektrophoretische Trennung der Plasmaproteine keinen Zugang in das klinisch-chemische Labor gefunden. Dies liegt vor allem in dem verhältnismäßig großen technischen Aufwand der Methode begründet. Über ihr Gelingen entscheiden oft geringste technische Faktoren. Schon SMITHIES hat die Bedeutung der technischen Details für das optimale Ge-

lingen der Methode betont. Deswegen bedarf die Stärkegelelektrophorese neben exakter Arbeitsweise eines speziellen Trainings der ausführenden Person. So läßt sich erklären, daß diese Methode trotz ihres hohen Trennvermögens fast ausschließlich von Forschungslaboratorien mit speziellen Aufgaben benutzt wird.

Aus den bisherigen Untersuchungen ergibt sich, daß die Reproduzierbarkeit der stärkegelelektrophoretischen Trennung den Anforderungen einer quantitativen Auswertung noch nicht genügt.

Nach einer Sichtung der bisher vorliegenden methodischen Angaben und unter Berücksichtigung der einleitend dargestellten allgemeinen Gesetzmäßigkeiten der Stärkegelelektrophorese erschien folgender Gang der Untersuchung erforderlich:

1. Abänderung und Ergänzung der Apparatur von SMITHIES unter Berücksichtigung der für die Trägerelektrophorese gültigen Gesetzmäßigkeiten.

2. Entwicklung einer optimalen und standardisierten Arbeitsweise unter besonderer Berücksichtigung der Gelaufbereitung und der Gelgießtechnik sowie der Einfülltechnik des Serums.
3. Eine systematische Untersuchung der Abhängigkeit der Wanderung von Puffer, Feldstärke und Temperatur.

Im folgenden wird eine Arbeitstechnik der Stärkegelelektrophorese nach diesem Plan entwickelt und eingehend beschrieben. Ihre Reproduzierbarkeit wird geprüft,

I. Apparatur.

Kammer: die Versuche wurden mit der von SMITHIES (27.) beschriebenen Kammer begonnen; die mit der Verwendung dieser Kammer verbundene Arbeitstechnik zeigte folgende Nachteile:

1. Vor jedem Versuch mußte der Deckel mit dem Kamm zusammengeschraubt, mit einem dünnflüssigen Paraffin eingeölt und in den Wärmeschrank gestellt werden.
2. Beim Aufsetzen des Deckels bestand immer die Schwierigkeit, den Kamm exakt im rechten Winkel in das Gel einzupassen; wenn nur geringste Gelreste zwischen Deckel und Kammerrand stehen blieben, so gelangte der Kamm nicht in die geforderte senkrechte Stellung zur Gelplatte.
3. Nach dem Abkühlen des Gels mußte der Deckel wieder auseinandergeschraubt und abgehoben werden; bei dieser Manipulation kam es immer wieder vor, daß Gel und Schlitze mechanisch beschädigt wurden. Eine solche Kammer ist für die Elektrophorese nicht mehr geeignet und muß neu gefüllt werden, was eine Wiederholung der zeitraubenden Vorbereitungen erfordert. In dieser Kammer machte sich der Elektrodecantationseffekt immer ungünstig bemerkbar.

Um die oben genannten Störungsmöglichkeiten und Fehlerquellen zu vermeiden, wurde die Originalkammer nach SMITHIES in dieser Arbeit abgeändert. Hierbei konnten Modifikationen übernommen werden, die sich aus der Be-

schreibung einer Elektrophoresekammer der Firma BÜCHLER ergeben. Als erstes wurde der Kamm auswechselbar in den Boden eingepaßt. So wurde erreicht, daß der Kammerdeckel aus einer einfachen Plastikplatte besteht. Dies hat zur Folge, daß nach dem Eingießen des Gels der Kammerdeckel ohne weiteres mit Klammern auf den Kammerrand gepreßt werden und bis zum Ende der Elektrophorese befestigt bleiben kann. Zum Einfüllen des Serums wird die Kammer auf den Deckel gewendet und der Kamm aus seiner Führung herausgehoben. Außer der schmalen Region um den Schlitz bleibt das Gel bedeckt. Dieser schmale Streifen wird sodann nach dem Einfüllen des Serums mit Paraffin versiegelt. Diese Einpassung des Kammes erlaubt eine relativ gefahrenlose Handhabung, sodaß keine Beschädigung der Schlitze auftritt. Ihre rechteckige Form bleibt gewahrt.

Bei der von SMITHIES beschriebenen Stärkegelelektrophorese beträgt die Geldicke 6,5 mm. Diese Schichtdicke stellt relativ hohe Anforderungen an die Geometrie der Schlitze (Elektrodecantation), die Einfülltechnik des Serums und die Thermostatisierung (Bandenimperfektion) der Apparatur.

Versuche mit der Apparatur von SMITHIES zeigten, daß die erwähnten Effekte nicht ausgeschaltet werden können. Es wurde deshalb erstens die Schichtdicke des Gels reduziert und zweitens die Thermostatisierung durch An-

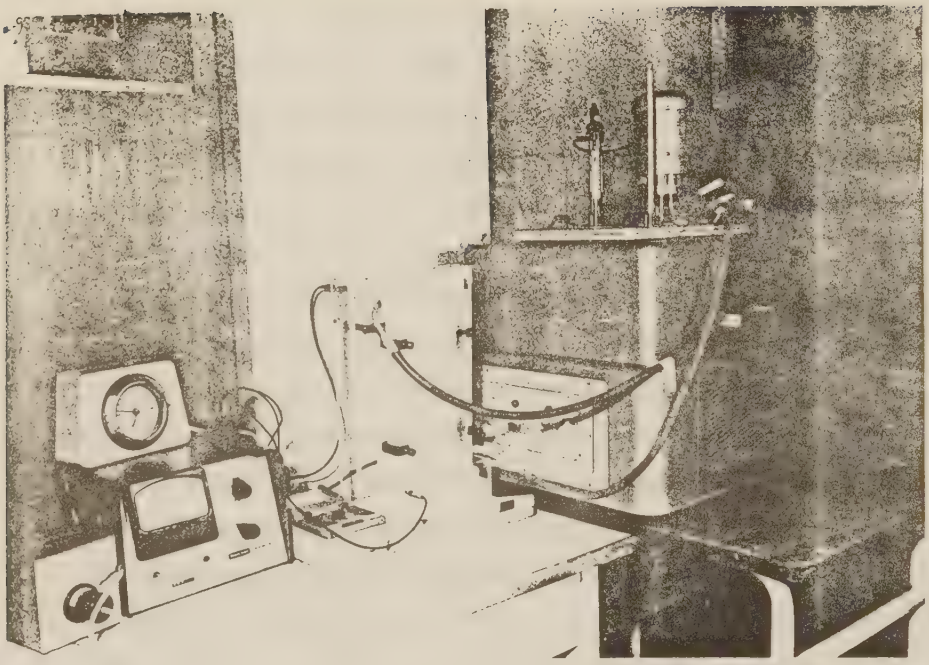


Abb. 6. Gesamtansicht der in dieser Arbeit benutzten Apparatur. Wannen und Haltevorrichtung eigene Herstellung.

bringen einer Kühlplatte verbessert. Nach vergleichenden Untersuchungen mit Wannentiefen zwischen 1 und 6 mm ergab sich, daß eine optimale Technik und Bandenzeichnung bei einer Wannentiefe von 3 mm erreicht wird. Eine bestmögliche Thermostatisierung wurde durch Anbringen einer zusätzlichen Kühlplatte erreicht; diese Kühlplatte wird mit einer Kühlflüssigkeit durchströmt, deren

Temperatur durch einen kryomaten auf einen gewünschten Wert geregelt wird. (Abb. 6.)

Haltevorrichtung: zur Ausschaltung der ungünstigen Effekte der Elektrodecantation ist es außerdem notwendig, die gesamte Apparatur in eine Haltevorrichtung einzupassen. Diese garantiert, daß alle Teile zueinander im Lot stehen. Die Fußplatte der Vorrichtung ist mit Stellschrauben und einer Wasserwaage versehen.

Elektroden: an Stelle der von SMITHIES angegebenen Ag/AgCl-Elektroden wurden Platinelektroden verwandt; sie sind praktisch unbegrenzt haltbar.

II. Arbeitstechnik.

1. Gelbereitung: die Beschreibung der optimalen und standardisierten Gelbereitung und des Gelgießens wird in einer Arbeitsvorschrift für die im Rahmen dieser Untersuchung entwickelte Technik der Stärkegelelektrophorese wiedergegeben.

2. Einfüllen des Serums: ein Einfüllen des Serums mit Pipetten hat sich auch für geübte Personen als schwierig erwiesen. Es wurde daher das Serum mit einer Tuberkulinspritze eingefüllt. Einer geeigneten Kanüle wurde ein genügend dünner Plastikschlauch aufgesetzt, um eine Beschädigung der Schlitzränder beim Einfüllen möglichst

zu vermeiden. Damit bleibt die Geometrie der Einfüllschlitze gewahrt.

III. Puffersysteme.

Das Profil und die Trennschärfe eines Serumpherogramms werden vor allem durch die Wahl des Puffersystems bestimmt. Bei der Serumauftrennung arbeiten die verschiedenen Systeme bei weitgehend gleichem pH; sie unterscheiden sich aber hinsichtlich ihrer Ionenzusammensetzung und Ionenstärke und außerdem in ihrer Ionenverteilung entlang der Strecke des Pherogramms.

Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde mit drei Puffersystemen gearbeitet: 1. Boratpuffersystem
2. TRIS-Citronensäure-System
3. Mischpuffer aus 1. und 2.

Puffer 1. und 2. wurden aus der Literatur übernommen, mit Puffer 3. wurde hier erstmals gearbeitet.

Berechnung der einzelnen Puffer:

1. Boratpuffer:

0,3 m Borsäure - o,o5 m NaOH = Brückenlösung

o,o26 m Borsäure - o,o1 m NaOH = Gelpuffer

Borsäure H_3BO_3

$K_1' = 7,3 \cdot 1o^{-1o}$ $pK' = 9,14$

$K_2' = 1{,}8 \cdot 10^{-13}$ $\quad pK' = 10{,}25$

$K_3' = 1{,}6 \cdot 10^{-14}$ $\quad pK' = 13{,}8$

Alle Werte gelten für 20 ° C.

Aus Gründen der Elektroneutralität gilt:

$$[H^+] + [Na^+] = [H_2BO_3^-] + [OH^-]$$

Bei einem pH-Wert von 8,9 liegen 10^{-9} $[H^+]$ vor. Gegenüber 10^{-2} $[Na^+]$ sind diese zu vernachlässigen. Bei demselben pH-Wert liegen 10^{-5} $[OH^-]$ vor; auch sie sind gegenüber $2{,}6 \cdot 10^{-2}$ $[H_2BO_3^-]$ zu vernachlässigen. Demnach gilt:

$$[Na^+] = [H_2BO_3^-]$$

Bei einer vorgegebenen Pufferkonzentration bedeutet dies, daß $2{,}6 \cdot 10^{-2} - 1 \cdot 10^{-2} = 1{,}6 \cdot 10^{-2}$ Borsäuremoleküle undissoziiert vorliegen.

Die Ionenstärke ist demnach $[Na^+] = \underline{\underline{1 \cdot 10^{-2}}}$

Die Ionenstärke der Brückenlösung beträgt

$$[Na^+] = \underline{\underline{5 \cdot 10^{-2}}}$$

2. Trishydroxymethylaminomethan-Citronensäure-Puffer

0,076 m TRIS – 0,005 m Citronensäure (Gel)

Citronensäure:

$K_1' = 7{,}447 \cdot 10^{-4}$ $\quad pK' = 3{,}128$

$K_2' = 1{,}73 \cdot 10^{-5}$ $\quad pK' = 4{,}76$

$K_3' = 4{,}027 \cdot 10^{-7}$ $\quad pK' = 6{,}395$

Trishydroxymethylaminomethan:

$K_b = 1{,}191 \cdot 10^{-6}$

$K_a = 8{,}439 \cdot 10^{-9}$ $\qquad pK_a' = 8{,}076$

Die ionale Konzentration Γ ist gegeben durch die Gleichung

$$\Gamma = [H^+] + [OH^-] + [\text{Citrat}] \cdot 3^2 + [TRIS^+]$$

Bei einem pH von 8,7 ist nur ein gewisser Anteil des Trishydroxymethylaminomethans ionisiert. Dieser Anteil läßt sich nach der HENDERSON-HASSELBALCH'schen Gleichung berechnen:

$$pH = pK_a' + \log \frac{a_B}{a^+_B}$$

Da $a_o = a_B^+ + a_B$, folgt für ein $a_o = 0{,}076$ und ein $pK_a' = 8{,}076$ eine molare Konzentration von ionisiertem Trishydroxymethylaminomethan von $1{,}52 \cdot 10^{-2}$. Aufgrund der pK'- Werte der Citronensäure muß die Konzentration der Citronensäure in Äqu/L gleich der molaren ionisierten Trishydroxymethylaminomethankonzentration sein: $3 \cdot 5 \cdot 10^{-3} = 1{,}52 \cdot 10^{-2}$ Äqu/L Citronensäure.

Bei erlaubter Vernachlässigung der $[H^+]$ und der $[OH^-]$ ist die ionale Konzentration Γ gegeben durch

$$\Gamma = 12 \cdot [\text{Citrat}]$$

Die Ionenstärke $\frac{\Gamma}{2} = 6 \cdot [\text{Citrat}] = \underline{\underline{3 \cdot 10^{-2}}}$

3. Mischpuffer:

o,o13 m Borsäure - o,o5 m NaOH - o,o38 m TRIS - o,oo25 m Citronensäure

die ionale Konzentration ist gegeben durch:

$$\Gamma = [H^+] + [OH^-] + [H_2BO_3^-] + [Na^+] + [Citrat] \cdot 3^2 + [TRIS^+] \qquad (1.)$$

aus Gründen der Elektroneutralität gilt:

$$[H^+] + [Na^+] + [TRIS^+] = [H_2BO_3^-] + [Citrat] \cdot 3^2 + [OH^-] \qquad (2.)$$

Durch Einsetzen von 2. in 1. ergibt sich:

$$\Gamma = 3[Citrat] + [Citrat]\ 3^2 + 2[H_2BO_3^-]$$

$$\Gamma = 12[Citrat] + 2[H_2BO_3^-]$$

Für pH 8,7 sind $[H^+]$ und $[OH^-]$ zu vernachlässigen. Aufgrund der pK'- Werte sind $[Na^+]$ und $[Citrat]$ bei diesem pH-Wert vollkommen dissoziiert. Borsäure und TRIS sind nur zum Teil dissoziiert.

Berechnung des dissoziierten Borsäureanteils: nach HENDERSON-HASSELBALCH gilt

$$pH = pK + \log \frac{[H_2BO_3^-]}{[H_3BO_3] - [H_2BO_3^-]}$$

$$o,56 - 1 = \log \frac{[H_2BO_3^-]}{[H_3BO_3] - [H_2BO_3^-]}$$

$$o,364 = \frac{[H_2BO_3^-]}{[H_3BO_3] - [H_2BO_3^-]}$$

$$\left[H_2BO_3^-\right] = 3{,}5 \cdot 10^{-3}$$

Die ionale Konzentration beträgt also

$$\Gamma = 12 \cdot 2{,}5 \cdot 10^{-3} + 2 \cdot 3{,}5 \cdot 10^{-3}$$

Die Ionenstärke beträgt

$$\frac{\Gamma}{2} \doteq 15 \cdot 10^{-3} + 3{,}5 \cdot 10^{-3}$$

$$= \underline{\underline{1{,}85 \cdot 10^{-2}}}$$

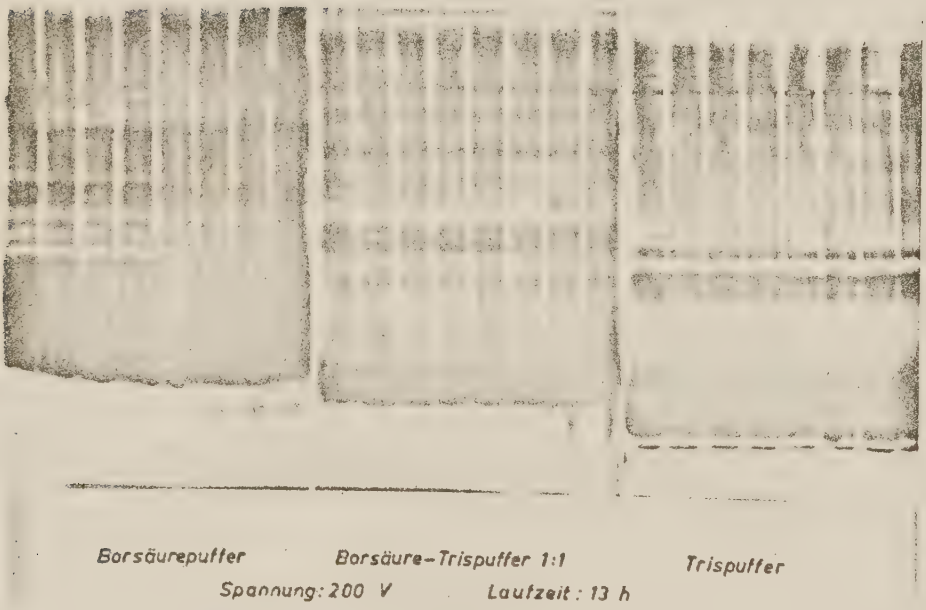


Abb. 7. Vergleich der SGE-Pherogramme eines menschlichen Normalserums mit drei verschiedenen Puffern.

In der Abb. 7. sind die Pherogramme eines normalen menschlichen Serums wiedergegeben, die unter sonst gleichen Bedingungen mit drei verschiedenen Puffern erhalten wurden. Man erkennt deutlich Unterschiede zwischen den drei Pherogrammen hinsichtlich der Laufstrecken und der Bandenbreiten.

Die Ionenverteilung über die Strecke des Pherogramms bei den einzelnen Puffern: der Strom I, die Eigenladung z der Ionen, die Anzahl N der Ionen und deren Wanderungsgeschwindigkeit u im elektrischen Einheitsfeld hängen in folgender Weise zusammen:

$$I = e_o \, q \, (N_+ \, z_+ \, u_+ + N_- |z_-| \, u_-)$$

wobei e_o = Elementarladung

q = Querschnitt

Damit ist bei konstanter Spannung U

$$R = \frac{1}{e_o \, (N_+ z_+ u_+ + N_- |z_-| u_-)} \cdot \frac{1}{q}$$

Es ist also berechtigt, bei einem vorgegebenen Puffer aus der Messung der Spannungsgradienten entlang der Pherogrammstrecke quantitative Rückschlüsse zu ziehen über die Ionenverteilung in den einzelnen Pherogrammabschnitten. Im Falle einer homogenen Ionenverteilung ist also für ein Puffersystem der Spannungsabfall konstant. Ist die Ionenverteilung nicht homogen, so muß an Stellen niederer Konzentration ein Spannungsabfall auftreten. Solche Potentialsprünge wurden bei der Se-

rumelektrophorese im Bereich der Postalbumine beobachtet (24.).

Die Bereiche erhöhten elektrischen Widerstandes bedingen auch eine verstärkte Wärmeentwicklung pro Zeiteinheit; denn die JOULE'sche Wärme Q ist gegeben durch

$$Q = c \cdot U \cdot t \cdot e_o \cdot q \left(N_+ z_+ u_+ + N_- |z_-| u_- \right)$$

wobei z = Konstante

t = Zeit in Sekunden.

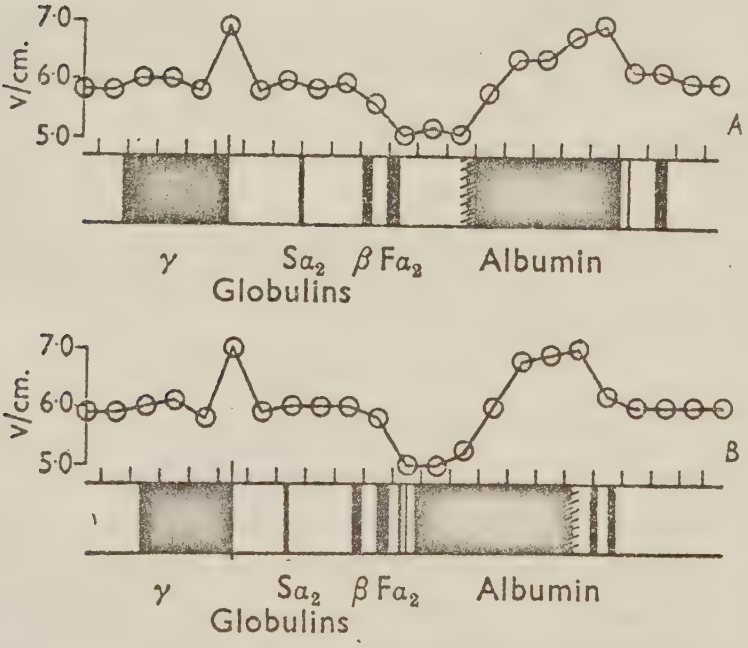


Abb. 8. Messung des Potentialverlaufs für Boratpuffer nach SMITHIES (24.).

Abb. 8. zeigt Messungen der Potentialverläufe für verschiedene Stärkegelkonzentrationen bei Verwendung des Boratpuffers nach SMITHIES (24.). Messungen des Potentialverlaufes für den in der vorliegenden Untersuchung verwendeten Mischpuffer konnten aus technischen Gründen bislang nicht vorgenommen werden.

IV. Messung der Abhängigkeit der Wanderungsgeschwindigkeit von Feldstärke und Temperatur.

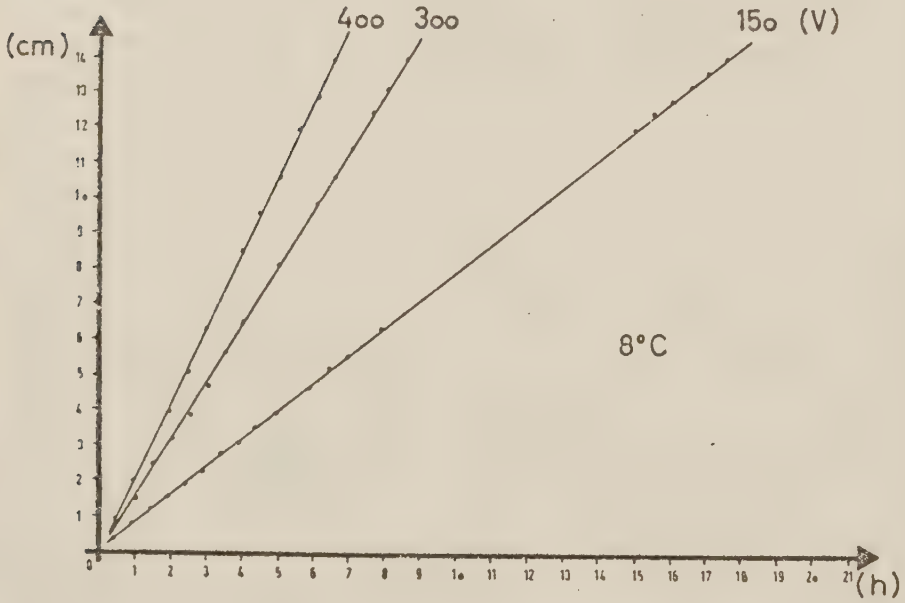


Abb. 9. Abhängigkeit der Wanderungsgeschwindigkeit von der Feldstärke bei konstanter Temperatur. Methodik s. Text.

In der Abbildung 9. ist die Wanderung (Abstand Auftragungsstelle bis Vorderfront der Albuminbande in cm) für Elektrophoresezeiten von 0,5 - 16 Stunden und Spannungen von 150, 300 und 400 Volt wiedergegeben. Die Temperatur wurde bei diesen Versuchen auf + 8° C kon-

stant gehalten. Die Position der Albuminbande wurde durch Anfärben des Serums mit Bromphenolblau markiert.

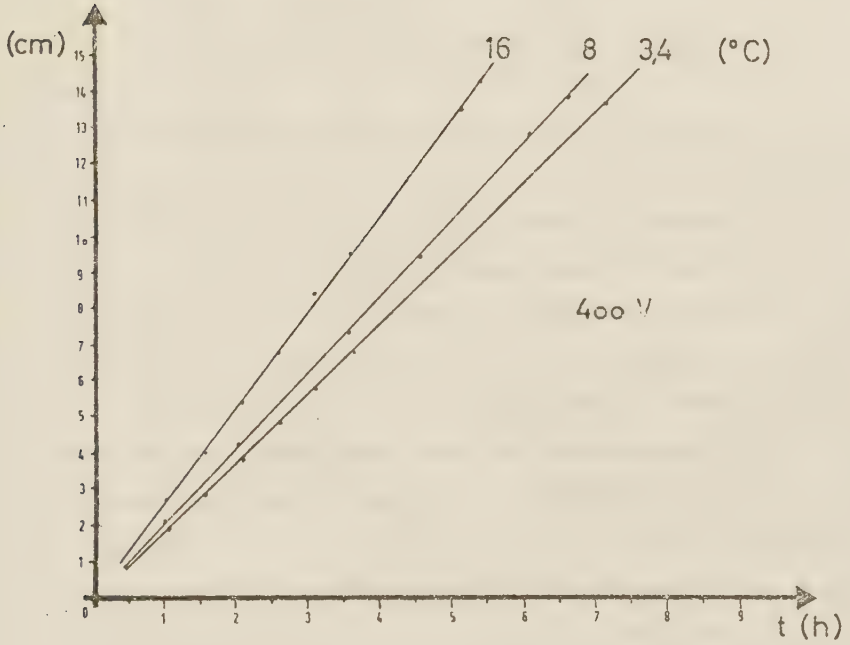


Abb. 1o. Abhängigkeit der Wanderungsgeschwindigkeit von der Temperatur bei konstanter Spannung. Methodik s. Text.

In der Abb. 1o. ist die Wanderung (Abstand Auftragungsstelle bis Vorderfront Albuminbande in cm) für Elektrophoresezeiten von 1 - 7 Stunden und eine Spannung von 4oo Volt bei Temperaturen von + 3,4° C, + 8° C und + 16° C wiedergegeben. Die Position der Albuminbande wurde durch Anfärben des Serums mit Bromphenolblau markiert.

V. Arbeitsvorschrift für eine standardisierte Durchführung der vertikalen Stärkegelelektrophorese.

1. Glasgeräte und Apparaturen:

- Spezial-Elektrophoresekammer (3 mm Typ)
- 1 Kühldeckel
- Kryomat (Minimum + 3° C)
- 8 Spezialdeckelklemmen
- mehrere Tuberkulinspritzen
- 1 Heizplatte
- 1 Wasserstrahlpumpe
- Spezialhaltevorrichtung für Elektrophoresekammer
- 2 Elektrodenkammern mit eingebauten Platinelektroden
- Filterpapier in der Größe von ca. 8 X 14 cm
- Spannungsstabilisator
- Ampèremeter
- Kontaktthermometer
- mehrere Glaswannen mit Deckel (15 X 25 X 7 cm)
- mehrere Kunststoffmatten in der Größe einer Elektrophoresekammer.

2. Substanzen:

- Kartoffelstärke SERVA Nr. 35 370
- Citronensäure MERCK Nr. 241

- Borsäure MERCK Nr. 165
- Tris (hydroxymethyl) - aminomethan

$C_4H_{11}NO_3$ Mol: 121,14

- Natronlauge

3. Arbeitsvorschrift:

Gelbereitung: für die Elektrophorese bereitet man ein Gel aus 400 ml Puffer und 52 g Stärke; dies entspricht einer Gelkonzentration von 13 %. Der erforderliche Puffer setzt sich zu gleichen Teilen aus den angegebenen Borat-und TRIS-Puffern zusammen. Ein Viertel des gesamten Puffervolumens nimmt man zur Suspension der 52 g Stärke; die restlichen 300 ml werden bis auf einen kleinen Rest auf einer normalen elektrischen Heizplatte zum Sieden gebracht. Dazu füllt man am besten die Pufferlösung in ein 600 ml fassendes Becherglas, welches man in ein Wasserbad stellt. Sofort bei Beginn des Siedevorganges wird - unter weiterem Erhitzen - die kalte Stärkesuspension in die heiße Pufferlösung eingerührt; mit der geringen im Meßzylinder verbliebenen Puffermenge spült man die Suspensionsreste aus. Ständiges Rühren mit einem Glasstab vermeidet einmal Verklumpungen, zum anderen vermittelt es einen guten Eindruck vom Viskositätszustand des Gels. Unter den angegebenen Bedingungen wird etwa nach 1 - 2 Minuten eine Temperatur von 60 ^{o} C erreicht, und die Flüssigkeit wird augenblicklich breiig. Nach weiteren 30 Sekunden

nimmt die Konsistenz wieder ab, wobei eine Temperatur von 85° C erreicht ist. Genau in diesem Augenblick beendet man das Erhitzen und gießt das klare Gel unverzüglich in eine ausreichend große Saugflasche, die Raumtemperatur besitzt. Das in der Saugflasche befindliche Gel entgast man sogleich durch Anlegen eines Wasserstrahlpumpen-Vakuums; dabei gerät das Gel kurzfristig in heftiges Sieden. Nach ca. 2 Minuten sind die letzten Bläschen aus dem Gel gewichen. Nun wartet man, bis das Gel eine Temperatur von genau 5o° C erreicht hat. Bei dieser Temperatur besitzt das Gel die optimale Konsistenz zum Eingießen in die Elektrophoresewanne.

Gießen: die günstigsten Elektrophoresewannen sind 3 mm Wannen mit einem in den Boden eingeführten Kamm. Es gehört bereits zur Vorbereitung, daß man eine solche Wanne mit befestigtem Kamm hergerichtet hat; ebenso müssen der Deckel und die Deckelklemmen am Arbeitsplatz bereitliegen. Alle Plastiksachen sind sauber und trocken. Zur Reinigung verwendet man in der Regel nur Wasser, da Reinigungsmittel zu Blasenbildungen innerhalb des Gels und damit zum Einreißen der Gelplatte führen. Das Eingießen erfolgt langsam und in einem Zuge. Die Wanne muß an allen Stellen zum Überlaufen gefüllt sein. Nochmaliges Übergießen einzelner Stellen verursacht Schlieren-und Blasenbildungen. Eventuell auftretende Bläschen kann man sofort mit einer sauberen Nadel beseitigen.

Der Deckel wird behutsam in folgender Weise angebracht: man setzt die Schmalseite des Deckels auf eine entsprechende Kante der Wanne und dreht sodann den Deckel um diese Achse in Richtung auf die Wanne zu. Der Deckel drückt dabei das überflüssige Gel zur Seite und schiebt einen Wulst vor sich her. Kurz bevor er aufzuliegen kommt, setzt man mit einer Hand die Deckelklemmen, während die andere Hand den Deckel in seiner Lage fixiert (Verschiebungen führen zu späteren Einrissen). Die Klemmen werden abwechselnd rechts und links angesetzt. Wenn alle acht Klemmen befestigt sind, muß der Deckel an beiden Kanten festen Kontakt haben.

Die Wanne bleibt vier Stunden unberührt an der selben Stelle stehen. Zu vermeiden sind Transport oder rasches Abkühlen (z.B. im Kühlschrank).

Einfüllen des Serums: man wendet die Elektrophoresekammer auf den Deckel, sodaß der Kamm von oben zugänglich wird. Nach Entfernung der beiden Halteschrauben des Kammes läßt sich dieser leicht aus seinem Bett heben; dazu faßt man den Kamm an beiden Enden und hebt sie gleichmäßig an. Drehung der Kammachse und allzu starkes Abstützen auf dem Wannenboden sind eine häufige Ursache auftretender Geleinrisse. Der Kamm hinterläßt im Gel acht gleichgeformte Schlitze, in welche nun das Serum eingefüllt wird. Während des Einfüllens

muß die Wanne waagerecht liegen. Mit einer Tuberkulinspritze gibt man in jeden Schlitz o,o3 ml Serum. Beim Einfüllen ruht die rechte Hand mit der Spritze locker auf der Wanne, der Zeigefinger der linken Hand führt den aufgesetzten Probenschlauch in den Schlitz ein und fixiert ihn dort. Zur Überprüfung der Technik empfiehlt es sich, einen Schlitz mit Farbstoff, bzw. mit gefärbtem Serum (Bromphenolblau) zu füllen.

Man versiegelt die Schlitze mit einem gerade noch flüssigen Paraffin, welches vom Rande her in geringer Schichtdicke über sie läuft. Das Serum soll stets erst unmittelbar vor Beginn der Elektrophorese eingefüllt werden (Einschränkung der Bandenverbreiterung durch Diffusion).

Elektrophorese: nach Entfernen der beiden Stirnplatten der Kammer stzt man die Kammer in die Haltevorrichtung ein und justiert sie in beiden Ebenen. Die Verbindungen mit den Elektrodenkammern werden mit Hilfe von Filterpapierbrücken hergestellt, wobei darauf zu achten ist, daß sie dem Gel dicht anliegen. Nach Anschluß des Spannungsgerätes und des Kryomaten werden beide gleichzeitig eingeschaltet. Spannung und Temperatur wählt man je nach der gewünschten Wanderungsgeschwindigkeit; der Arbeitsbereich ist aus den kurven (Abb. 9. und 1o.) ersichtlich. Ein in den Stromkreis eingeschaltetes Ampèremeter zeigt eventuelle Widerstandsänderungen so-

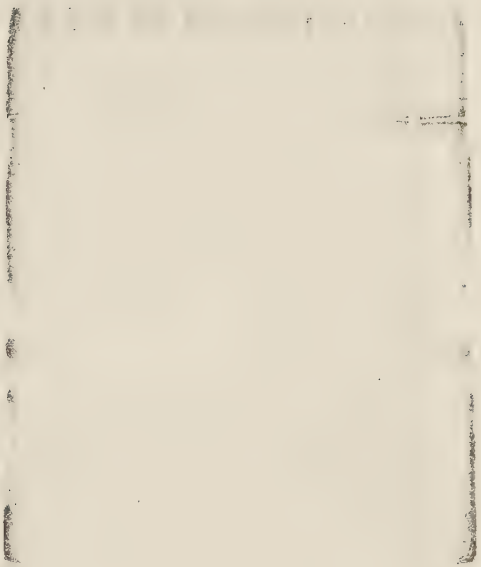
fort an.

Färben: das Gel wird wie ein Kuchen aus der Wanne gestürzt. Nach vorsichtigem Abheben des Deckels wendet man es auf ein Kunststoffnetz. In der Regel löst es sich beim Anheben der Wanne von einer Kante her. Stärkere Adhäsionsstellen lockert man mit einem langen, dünnen Spatel. Auf der Matte liegend wird das Gel in das Färbebad eingetaucht; die normale Färbezeit beträgt 2o Minuten. In vier nacheinander folgenden Bädern wird das Gel ausgewaschen und fixiert. In Waschlösung oder Glycerin kann man die Gelplatte über ein Jahr lagern.

VI. Anwendungsbeispiele.

Prüfung der Reproduzierbarkeit der entwickelten Methode am Beispiel verschiedener Serumproteinelektrophoresen. In allen Fällen wurde das im Rahmen dieser Untersuchung zusammengestellte Mischpuffersystem benutzt.

Die Abb. 11. bis 14. zeigen Photographien der Pherogramme verschiedener, nicht näher klassifizierter Serumproben von Patienten der I. Med. Universitätsklinik. Die Serumproben wurden willkürlich aus dem im Laboratorium der I. Med. Universitätsklinik anfallenden Material entnommen. Die Kammer wurde jeweils mit einer dieser Serumproben beschickt. Man erkennt eine durchschnittlich sehr gute und reproduzierbare Auftrennung der Proteinfraktion.

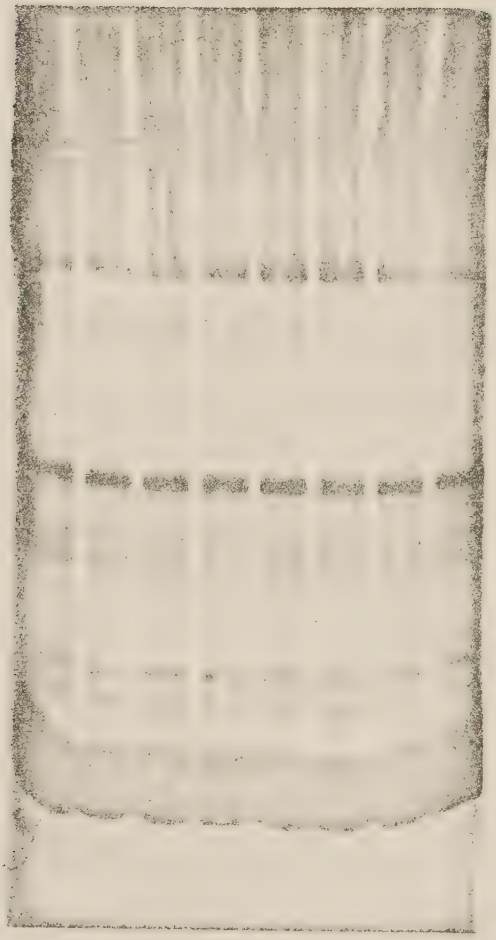


E. Nr. 45 Abb. 11.

Puffer: Mischpuffer

Feldstärke: 15o Volt

Temperatur: 3° C

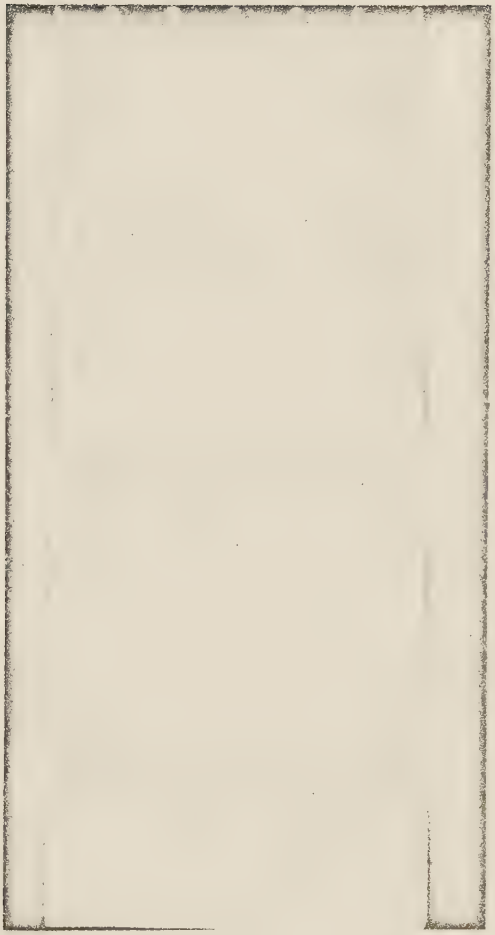


E. Nr. 63 Abb. 12.

Puffer: Mischpuffer

Feldstärke: 3oo Volt

Temperatur: 8° C

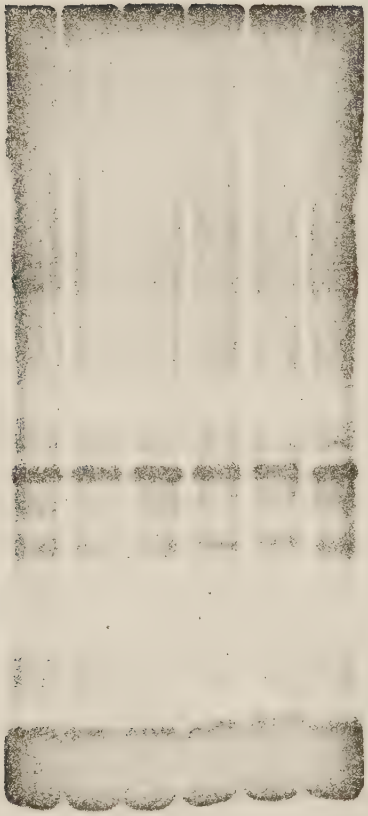


E. Nr. 65 Abb. 13.

Puffer: Mischpuffer

Feldstärke: 300 Volt

Temperatur: 8° C



E. Nr. 67

Abb. 14.

Puffer: Mischpuffer

Feldstärke: 4oo Volt

Temperatur: 8° C

A N H A N G

Das Stärkegelelektropherogramm.

Nach der Auftrennung der Plasmaproteine mit Hilfe einer neuen Elektrophoresemethode stellt sich die Frage nach der Nomenklatur der einzelnen Banden. Eine willkürliche Nomenklatur wie sie TISELIUS noch einführen konnte, wäre bei den nachfolgenden Methoden wenig sinnvoll gewesen. Beim Auftreten einer jeden neuen Bande erheben sich 2 Fragen:

1. In welcher Korrelation steht diese Bande zu denen der klassischen TISELIUS-Methode ?
2. Welche Proteine (genaue chemische Bezeichnung) sind in der Bande enthalten ?

Die beste und erstrebenswerte Nomenklatur benennt die Banden mit den spezifischen Namen der darin enthaltenen Proteine (z.B. Haptaglobin, Transferrin, Coeruloplasmin). Dies setzt aber oft langwierige Untersuchungen mit Spezialfärbungen, immunologischen Methoden und der Ultrazentrifuge voraus. Die Banden des Stärkegelelektropherogramms sind bis heute nicht lückenlos mit spezifischen Proteinen identifiziert.

Als Basisnomenklatur bietet sich eine Nomenklatur an, welche die Beziehung der neuen Banden zu den klassischen

zum Ausdruck bringt; die Schwierigkeit, diese Beziehung aufzuzeigen, ist gering. SMITHIES und POULIK (25) haben dazu die zweidimensionale Stärkegelelektrophorese entwickelt: zunächst wird ein Serum mit Hilfe der Filterpapierelektrophorese aufgetrennt; der noch feuchte und unfixierte Streifen wird sodann zur Stärkegelelektrophorese gegeben, welche die bereits getrennten Proteine weiter aufgliedert. Die Laufrichtung der Stärkegelelektrophorese ist rechtwinklig zu derjenigen im Filterpapierstreifen. Am Rande des gleichen Stärkegels wird eine Probe des Originalserums aufgetrennt. Diese zweidimensionalen Pherogramme (Abb. 2o.) zeigen, daß die Stärkegelelektrophorese die klassischen Fraktionen nicht in einfacher Weise aufgliedert, sondern daß sie die Komponenten auch an anderen Stellen lokalisiert, d.h. die Komponenten der Alpha 1-Fraktion liegen nicht unbedingt in ihrer Gesamtheit zwischen der Hinterfront der Albumine und der Vorderfront von Alpha 2, sondern eine Komponente liegt z.B. noch vor der Vorderfront der Albumine. Das zweidimensionale Pherogramm ist die Grundlage der heute gültigen Nomenklatur, welche die Banden folgendermaßen benennt:

Die Fraktionen der klassischen Filterpapierbanden in der Stärkegelelektrophorese werden in der Reihenfolge ihrer Lokalisation in der Richtung von der Anode zur Kathode mit A, B, C usw. gekennzeichnet. Beispiel: die am weitesten anodenwärts gelegene Bande

aus Alpha 2 ist Alpha 2 A. Diese Benennung stellt die Basisnomenklatur dar. Alle Banden, welche genau identifiziert sind, werden mit ihren spezifischen Namen belegt.

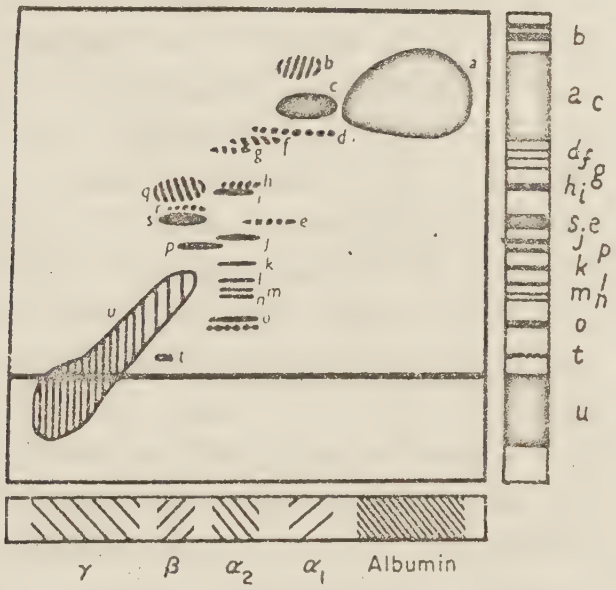


Abb. 15. Schematische Darstellung eines zweidimensionalen Stärkegelelektropherogramms. (19)

Die Besprechung der Nomenklatur erfolgt an Hand von Abb. 15. Die Albuminfraktion a ist auch in der Stärkegelelektrophorese einheitlich. Alpha 1 wird in 3 Fraktionen b, c und d aufgetrennt, wovon b das Glykoproteid " Orosomucoid " darstellt; c stellt den größten Teil der Fraktion dar, liegt aber bei der eindimensionalen Stärkegelelektrophorese unaufgelöst

in der Albuminbande; d ist identisch mit dem Coeruloplasmin. Komponenten, welche chemisch noch nicht eindeutig bestimmt sind, werden natürlich nach den Prinzipien der Basisnomenklatur benannt. Der Alpha 1-Anteil, welcher in der Albuminbande unaufgelöst liegt, wird demnach als Alpha 1 B bezeichnet, Die Alpha 2 Fraktion liefert die Mehrzahl der in der Stärkegelelektrophorese neu auftretenden Banden: f und g sind die " Postalbumine " einer älteren Nomenklatur und werden als Alpha 2 A und B bezeichnet; h entspricht einer Haptoglobinbande, ebenso die Banden j, k, l, m; i wird zum Teil auch als F Alpha 2 bezeichnet, wobei F " fast " (engl.) bedeutet. o ist das Alpha 2 - Makroglobulin mit dem Sedimentationskoeffizienten 19 S. Die Betafraktion wird in q, r, s, t aufgetrennt, wovon s die größte Bande darstellt; sie entspricht dem Transferrin C. Die Bande t enthält das hochmolekulare Beta-Lipoprotein. In der Regel wird eine weitere Auftrennung der Gamma-Globuline nicht beschrieben. ASHTON (3) berichtet allerdings, daß sie mit Hilfe eines Phosphatpuffers gelungen sei.

Vor dieser Nomenklatur hatte SMITHIES eine rein beschreibende Nomenklatur angegeben, welche eine konsequente Benennung der Vielzahl der später entdeckten Banden nicht zuließ. Trotzdem ist es auch heute noch nützlich, mit dieser Nomenklatur vertraut zu sein, da

sie wegen ihrer Anschaulichkeit bei Schnellinformationen einen guten Eindruck über die Lokalisation der Banden vermittelt:

Die größte und kräftigste Bande des Stärkegelelektropherogramms ist die Albuminbande. Die zwei Banden, welche schneller als diese laufen, bezeichnete SMITHIES als Präalbumin 1 und 2, wobei 1 die vorderste bedeutet. Die drei schwachen Banden, welche etwas langsamer laufen als die Hinterfront der Albumine, wurden zusammenfassend als Postalbumine bezeichnet. Die nächstlangsamere, relativ stark gefärbte Bande wurde als der am schnellsten wandernde Anteil der Alpha 2-Fraktion identifiziert. In dieser ersten Form der Nomenklatur wurden als konstante Banden nur noch die beiden auffallend stark gefärbten Banden zwischen F Alpha 2 und der Auftragstelle benannt: die schnellere wurde als die klassische Beta-Fraktion angesehen, die langsamere wurde als Teil der Alpha 2-Fraktion erkannt und im Gegensatz zu " fast " Alpha 2 Globulin als " Slow Alpha 2 Globulin " bezeichnet. Die Banden zwischen Beta und S Alpha 2 wurden von SMITHIES als Alpha-Beta-Proteine bezeichnet.

D. Z U S A M M E N F A S S U N G

Ausgehend von einer kurzgefaßten Charakterisierung der elektrokinetischen Erscheinungen werden die theoretischen und methodischen Voraussetzungen der Stärkegelelektrophorese nach O. SMITHIES dargestellt.

Eine Betrachtung des von O. SMITHIES angegebenen Verfahrens zeigt, daß im Interesse der Reproduzierbarkeit stärkegelelektrophoretischer Trennungen der Serumproteine die Apparatur von SMITHIES abgeändert und ergänzt und die Arbeitsweise hinsichtlich Gelaufbereitung und Eingießtechnik sowie Applikation der Serumproteine modifiziert werden kann. Diese Modifikationen werden im Detail begründet und dargestellt. Unter Anwendung der modifizierten Apparatur und Technik wird der Einfluß von Puffer, Feldstärke und Temperatur auf das Trennverhalten am Beispiel der Serumproteine untersucht.

Abschließend werden Beispiele stärkegelelektrophoretischer Trennungen von nicht ausgewählten Patientenseren wiedergegeben, wobei ein in der Untersuchung beschriebenes Mischpuffersystem zur Anwendung kommt. In einem Anhang wird die stärkegelelektrophoretische Fraktionierung der Serumproteine mit der papierelektrophoretischen Trennung in Beziehung gesetzt.

E. L I T E R A T U R N A C H W E I S:

1. ALTANER, C. — Preparative SGE of proteins. Chem. Communs. 26, 1727 (1961)

2. ALTANER C. — A review. Chem. Listy 56, 334 (1962)

3. ASHTON C. — Serum Protein Differences in Cattle by Starch Gel Electrophoresis. Nature 180, 917 (1957)

4. BLOEMENDAL H. — Starch Electrophoresis. III. Starch Gel Electrophoresis. Chromatog. 3, 509 (1960)

5. BÜCHNER M. — Moderne chem. Methoden in der Klinik, Thieme Verl. (1961)

6. CHONG WAN LEE — Soluble starch in SGE. Seoul J. Med. 3, 89 (1961)

7. DEBRAY - SACHS M.
LEMOINE B.
Attempt to apply electrophoresis over starch gel to current clinical practice.
Ann. Biol. Chim. 16, 397 (1958)

8. DITTMER A.
Papierelektrophorese: Grundlagen - Methodik - Klinik.
Gustav Fischer Ver. Jena, (1961)

9. FINE J. M.
WASZCZENKO E.
Preparation of Transparent Starch Gels after Electrophoresis.
Nature, 181, 269 (1958)

1o. FINE J. M.
WASZCZENKO E.
LOEB J.
High Resolution of Human Plasma Components by Starch Gel Electr.
Nature, 182, 452 (1958)

11. FRANLEN G.
GOSSELIN C.
Separation of Metastable Polymers by Starch Gel Electrophor.
Nature, 181, 1152 (1958)

12. HOLLENDER A.
A technical improvement in the preparation of starch gel for electrophoresis according to SMITHIES.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 14, 1o4, (1962)

13. INGBAR S. H.
KENNETH A.
WOEBER
Observations concerning the Thyroxine - Binding Site of Prealbumin in Human Serum. Endocrinology, 75, 917 (1964)

14. KORTÜM G.
Lehrbuch der Elektrochemie . Verlag Chemie GmbH. (1957)

15. MURRAY K.
A continous elution method of preparative SGE. Anal. Biochem. 3, 415 (1962)

16. PERT H.
PINTERIC L.
Quantitation of SGE. Ann. Ny. Acad. SCI. 121 (2) 31o (1964)

17. POULIK M. D.
Starch Gel Electrophoresis in a discontinous System of Buffers. Nature 18o, 1477 (1957)

18. POULIK M. D.
SMITHIES O.
Comparison and Combination of the Starch - Gel and Filter - Paper Electrophoretic Methods Applied to Human Sera: Two - Dimensional Electrophoresis. Biochem. J. 68, 636 (1958)

19. PUTMAN F. W. Structure and Function of the Plasma Proteins. The Proteins III. Edited by NEURATH H. Academic Press

2o. RAYMOND S. Apparation for vertical SGE. Clin. Chem. 8, 455 (1962)

21. RAMSEY A. Thin Layer SGE on Glass Slides. Analytical Biochemistry 5, 83 (1963)

22. RUTGERS A. J. Physical Chemistry Interscience Publishers

23. SMITHIES O. Grouped Variations in the Occurence of New Protein Components in Normal Human Serum. Nature 175, 3o7 (1955)

24. SMITHIES O. Zone Electrophoresis in Starch Gels: Group Variations in the Serum Proteins of Normal Human Adults. Biochemical J. 61, 629 (1955)

25. SMITHIES O.
POULIK M. D.
Two-dimensional Starch Gel Electrophoresis of Serum Proteins.
Nature 177, 1033 (1956)

26. SMITHIES O.
Variations in Human Serum Beta-Globulins.
Nature 180, 1482 (1957)

27. SMITHIES O.
An Improved Procedure for Starch-Gel Electrophoresis: Further Variations in the Serum Proteins of Normal Individuals.
Biochem. J. 71, 585 (1959)

28. SMITHIES O.
Zone Electrophoresis in Starch Gels and its Application to Studies of Serum Proteins.
Advances in Protein Chem. 14, 65 (1959)

29. SMITHIES O.
Molecular Size and Starch-Gel Electrophoresis.
Arch. Biochem. Biophys. Suppl. 1, 125 (1962)

30. VESSELENOVITSCH S. D. A Simple Method for making Starch-Gel Electrophoretic Strip Transparent. Nature 182, 665 (1958)

31. WIEME R. J. High Volt Electrophoresis. Ann. Ny. Acad. SCI. 121, (2) 366 (1964)

Herrn Prof. Dr. med. W. Leppla danke ich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und für seine stetige Unterstützung. Ebenso möchte ich meinen herzlichen Dank Herrn Prof. Dr. rer. nat. H. E. Keller aussprechen, der mich in die theoretischen Grundlagen dieser Arbeit eingeführt hat und dem ich auch zahlreiche Anregungen und Diskussionen zu den durchgeführten Versuchen verdanke.

Herrn H. Sutter, Physikalisch - technischer Assistent des Laboratoriums der Medizinischen Universitätsklinik sei aufrichtig gedankt für die unersetzliche Hilfe bei der technischen Realisierung der Stärkegel - Elektrophorese - Apparatur.

Lebenslauf

Am 5. 4. 1942 wurde ich in St. Ingbert als Sohn des Frisörs Alois Vogelgesang und seiner Ehefrau Herta, geb. Matz geboren. Nach dem Besuch der Volksschule in St. Ingbert von 1948 bis 1953 habe ich am dortigen Staatlichen Realgymnasium 1962 die Reifeprüfung abgelegt. Von 1962 bis 1967 habe ich an der Universität des Saarlandes Medizin studiert. Das Staatsexamen habe ich am 13. 12. 67 bestanden. Meine Medizinalassistentenzeit habe ich im St. Josefskrankenhaus Dudweiler abgeleistet. Approbation: 2. Januar 1969. Anschließend habe ich meine Weiterbildung zum Frauenarzt begonnen: bis zum April 1971 auf der gynäkologisch-geburtshilflichen Station des St. Josefskrankenhauses Dudweiler; seit dem 1. Mai 1971 bin ich als Assistenzarzt in der Frauenklinik des Heiliggeistkrankenhauses Saarbrücken tätig.